

Effects of high vitamin K intake on bone and vascular health

Citation for published version (APA):

Braam-Schreurs, L. A. J. L. M. (2002). *Effects of high vitamin K intake on bone and vascular health*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20021213lb>

Document status and date:

Published: 01/01/2002

DOI:

[10.26481/dis.20021213lb](https://doi.org/10.26481/dis.20021213lb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

8

Summary and general conclusions

Samenvatting en Algemene Conclusies

SUMMARY AND GENERAL CONCLUSIONS

Vitamin K is a group name for a number of related compounds, which have in common a methylated naphthoquinone ring structure, but which vary in the aliphatic side chain attached at the 3-position. The two most important forms of vitamin K are vitamin K₁ (phylloquinone) and the group of K₂ vitamins (menaquinones). Green vegetables such as broccoli and spinach, as well as some plant oils are the major source of phylloquinone in the human diet ¹⁻⁴. Menaquinones are primarily found in meat (menaquinone-4, MK-4) and fermented foods like cheese and curds (MK-6 through MK-9) ⁴. The only known function of vitamin K in mammals is that it serves as a cofactor for the endoplasmic enzyme gamma-glutamylcarboxylase. The vitamin K-dependent step is a posttranslational carboxylation reaction by which a number of well-defined peptide-bound glutamate residues are converted into gamma-carboxyglutamate (Gla) ⁵⁻⁷. Gla-residues form calcium-binding groups in proteins, and are essential for the correct functionality of these proteins. During episodes of vitamin K-deficiency the carboxylation reaction cannot proceed and undercarboxylated species of Gla-proteins are released in the circulation. A general literature overview on vitamin K is given in **chapter 1**.

The classical role of vitamin K is its requirement for normal blood coagulation: six different Gla-proteins are involved in the regulation of this complex process: prothrombin, factors VII, IX, and X, and the proteins C and S ⁸. More recently, it was discovered that other Gla-proteins function as regulator of bone formation (osteocalcin) ^{9,10}, inhibitor of cartilage and vascular calcification (MGP) ¹¹ and regulator of cell growth and apoptosis (Gas6) ¹². Gla-proteins seem to be important for bone and vascular health, and these two functions form the topic of this thesis. In the first part we describe the effects of vitamin K supplementation on bone health. Several authors have demonstrated that low serum vitamin K ¹³⁻¹⁵ and high circulating undercarboxylated osteocalcin concentrations ¹⁶⁻¹⁸ as well as low dietary intakes of vitamin K ¹⁹ are associated with low bone mineral density (BMD) and an increased risk for osteoporotic hip fractures. The two vitamin K intervention studies described in this thesis are the first clinical trials reported thus far in which the effects of vitamin K₁ supplementation on BMD in different risk groups are monitored. In **chapter 2** we have investigated the potential synergistic effect of vitamin K₁ and a mineral + vitamin D₃ supplement on bone loss in postmenopausal women during a 3-year treatment period. Participants received a daily supplement containing either a mixture of calcium, zinc, magnesium and vitamin D₃ or the same supplement with additional vitamin K₁; a third group received a placebo only. It turned out that the supplement containing minerals and vitamin D₃ transiently decreased the rate of bone loss. Addition of vitamin K₁ to this supplement, however, resulted in a long-term beneficial effect at the site of the femoral neck, leading to a 35% reduction of bone loss (as compared to placebo). It is to be expected that a more complete carboxylation of the bone Gla-protein osteocalcin contributes to the observed effects, but since the function of this protein on a molecular level has remained unclear thus far, the mechanism by which vitamin K promotes bone health remains a matter of speculation. It is at least encouraging that – although a complete halt of bone loss was not achieved in this study – the rate of bone loss

was substantially decreased by a simple food supplement. If this result may be extrapolated to longer treatment periods, the proposed formulation may result in a significant reduction of osteoporotic fractures. Our data have been applied by the nutrition industry, and the optimal formulation used in our study is presently marketed in several countries.

A second group at risk for rapid bone loss is formed by female endurance athletes. The high intensity and work load of training may lead to a disturbed hormonal metabolism, low endogenous oestrogen production, amenorrhoea, and loss of bone mass at young age ^{20,21}. Although these problems are well recognized among sport physicians, the number of prospective studies to quantify the bone loss and to monitor effect of treatment in this group is low. In **chapter 3** we report on a 2-year follow-up study among the largest cohort of female endurance athletes described thus far, in which we have quantified the rate of bone loss, and investigated the effects of oestrogen and vitamin K supplementation. Participants were recruited from Belgium, Germany and the Netherlands, and belonged to the national top in their sports. The rate of bone loss in female endurance athletes was unexpectedly high and a significant higher rate of femoral neck bone loss was found in the amenorrheic athletes compared to the eumenorrheic athletes. Oestrogen supplementation may retard, but did not prevent the bone loss. In contrast to the study in postmenopausal women, no beneficial effect of vitamin K was found in athletes. The most plausible reason for this apparent discrepancy is that bone loss is a multifactorial process in which also minerals and vitamin D play an important role. As a consequence an optimal effect of vitamin K will only be found if also the other components are supplemented. Another reason for the discrepancy between the data in postmenopausal women and female endurance athletes may be the accumulation of risk factors for bone loss in the latter group and the resulting extremely high rate of bone loss. It is at least feasible that under these conditions food supplements are inadequate tools to reverse this process, and that only medication such as bisphosphonates may prevent further damage.

In the second part of this thesis the function of vitamin K in vascular tissue was investigated. When hypothesizing about mechanisms underlying a possible relationship between vitamin K and vascular health, the most obvious protein involved is the vitamin K-dependent matrix Gla-protein (MGP), which is synthesized by the vascular smooth muscle cells in the arterial vessel wall. In experimental animals, MGP was found to be a potent inhibitor of soft tissue calcification ¹¹, and its five Gla residues are essential for this activity ²². Accumulating evidence suggests that in a substantial part of the population the vitamin K status of the arterial vessel wall is inadequate to support full MGP carboxylation ²³, which may contribute to cardiovascular calcification. The hypothesis that subclinical vitamin K-deficiency forms a risk factor for cardiovascular disease is the basis for the second part of this thesis. Consequences of such deficiency at the site of the arteries may be vascular hardening and calcification, increasing stiffness, and loss of elastic properties. Several studies were performed to establish the potential importance of vitamin K for vascular health. In the well-known Framingham Offspring cohort we have investigated the association between vitamin K intake and intermediary markers for cardiovascular disease. In **chapter 4** we describe the

associations between reported dietary vitamin K intake, lifestyle, and serum lipid concentrations in this cohort. It turned out that participants with a reported high vitamin K₁ intake had a healthy dietary pattern and a healthy overall lifestyle. Furthermore, higher reported vitamin K₁ intakes were associated with a lipoprotein profile indicative of decreased risk for developing cardiovascular disease (high HDL-cholesterol, low LDL-cholesterol, and low ratio of total cholesterol to HDL-cholesterol). In contrast to vitamin K₁, the reported dietary vitamin K₂ intakes were associated with an overall less healthy lifestyle pattern, including higher BMI, higher intakes of total fat, saturated fat, cholesterol and meat, and lower intakes of dietary fruit and fibre. Surprisingly, reported vitamin K₂ intakes in the current study were also associated with a favourable lipid profile. The magnitude of the effect of K₂ is remarkable, because vitamin K₂ forms about 10% of the total vitamin K content in the human diet. The fact that both in healthy and unhealthy lifestyles vitamin K intake was positively correlated with a favourable serum lipid profile, is consistent with the hypothesis that low vitamin K intake is an independent risk factor in the development of cardiovascular disease. A subsequent step in investigating the importance of high vitamin K intake for vascular health was to measure the effect of vitamin K supplements on vessel wall characteristics. The term vessel wall characteristics is used to describe the elastic properties and the intima-media thickness of the vessel wall. Changes in the elastic properties of the main arteries have major implications for the development of vascular disease. Arteries, especially the larger ones such as the common carotid artery, become stiffer during ageing and arterial stiffness has been shown to be associated with cardiovascular disease^{24,25}. Before investigating the effects of vitamin K supplementation on vessel wall characteristics, it was decided to monitor first in a prospective way the effects of ageing on vessel wall characteristics in healthy postmenopausal women (**chapter 5**). In this study we have measured with a 3-year interval the distensibility coefficient (DC) and the compliance coefficient (CC), both variables are generally used to describe the elastic properties of the vessel wall. With the same (ultrasound-based) technique, also the intima-media thickness (IMT) of the artery wall was measured²⁶⁻²⁸. The results showed a significant decrease in DC and CC of the common carotid artery as a function of time. In parallel with the decreased elasticity, we observed a significant increase of the arterial diameter and IMT of the common carotid artery. An increase in arterial diameter is the adaptation of the vessel wall to stiffening and the resulting increased blood pressure, whereas an increase of the IMT is generally regarded as one of the first steps in atherosclerosis^{29,30}. The same cohort as described in chapter 2 was used to study effects of vitamins D+K supplementation on the vessel wall characteristics in postmenopausal women (**chapter 6**). Participants received either placebo, minerals + vitamin D, or minerals + vitamins D + K. For recording the vessel wall characteristics the outcome variables mentioned in chapter 5 were used. The supplement containing minerals and vitamin D did not influence any of the outcome variables. However, the supplement with additional vitamin K had a long-term beneficial effect on the elastic properties of the carotid artery, namely, DC, CC and also the blood pressure remained constant over the entire 3-year period. In contrast to the effects on vascular elasticity, no effect of vitamin K was found on the IMT. To our knowledge, this is the first intervention study showing a beneficial effect of

vitamins K₁ + D supplementation on the vessel wall characteristics. These data are consistent with a common subclinical vitamin K-deficiency, sub-optimal MGP carboxylation, and inadequate protection against cardiovascular calcification in non-supplemented subjects. Clinical trials in which the effect of vitamin K supplements on the progression of calcification is measured by more sophisticated techniques (such as computed tomography) are needed to provide conclusive evidence for the importance of vitamin K in the prevention of cardiovascular disease.

On the basis of our present knowledge, MGP seems to be the most likely Gla-protein via which vitamin K exerts its beneficial effect on the vessel wall. MGP does not exclusively accumulate in tissue, but in low concentrations it also occurs in the circulation. If the concentration and Gla-content of MGP in serum would reflect vascular MGP synthesis and Gla-content, circulating MGP might be used as a marker either for cardiovascular risk assessment, or for the diagnosis of cardiovascular disease. In this respect we differentiate between assays for total MGP, which are based on antibodies recognizing any form of MGP, and conformation-specific assays, which are based on antibodies against either fully carboxylated or undercarboxylated MGP. In **chapter 7** we describe the development of such assay for total MGP. It is shown that in patients with atherosclerosis and diabetes mellitus the serum MGP concentration is significantly increased compared to age-matched healthy controls. The assay was also used to demonstrate that certain polymorphisms in the MGP gene are associated with a high or low MGP expression and parallel fluctuations in MGP serum concentrations. Although the results clearly show an association between serum MGP and cardiovascular disease, more work needs to be done before the diagnostic utility of this assay will be clear.

In conclusion, we have demonstrated that vitamin K₁ retards bone loss in postmenopausal women, but only if it is co-administered with minerals and vitamin D. We would recommend such products, therefore, for subjects at risk for bone loss (e.g. women after 50 years of age). If the effect continues during longer periods of supplementation, the threshold for osteoporotic fractures may shift to higher ages by 8-10 years, which must be regarded as a major benefit to public health and which may substantially contribute to the reduction of health care costs. The question of whether vitamin K alone is effective in counteracting high bone loss needs to be addressed since this could not be demonstrated in this thesis. Other questions remaining to be answered are: 1) are the effects of vitamins K₁ and K₂ of comparable magnitude, 2) what is the optimal dose for achieving maximal effect, 3) what is the optimal formulation of the supplement (e.g. other vitamins and minerals), and 4) is this formulation also of potential benefit for other groups at risk for high bone loss, such as endurance athletes, ballet dancers, astronauts during weightlessness, and patients with anorexia nervosa.

A second observation of potential importance was that vitamin K₁ strongly retards age-related loss of arterial elasticity. Because the vascular measurements formed the second arm of the study on bone density, it cannot be excluded that also in the vessel wall minerals and vitamins D and K have a synergistic effect. However, based on our present knowledge

this seems unlikely. Rather we would postulate that the observed effect is solely due to an improved vascular vitamin K status, resulting in a more complete MGP carboxylation and enhanced calcification inhibitory effect of this protein. Since at the dosage used no loss of elasticity was observed during the entire 3-year study, the minimal dose required for maintenance of elasticity remains to be established, and also the question of whether the effect may continue at much longer (lifelong?) intake of vitamin K. Without doubt this part of our work has the potency of a breakthrough in the primary and secondary prevention of cardiovascular disease.

The data on the utility of serum MGP as a marker for cardiovascular disease are promising but need further exploration. The assay described is a typical home-made lab test, and has been improved considerably since our first publication. In parallel with this assay for total circulating MGP antigen, assays for carboxylated and undercarboxylated fractions thereof are badly needed. Monoclonal antibodies on which such assays are necessarily based, are being developed at this time. Data presented in this thesis demonstrate the feasibility of the diagnostic approach, and form the start of an independent diagnostics line in our group. Apart from their potential importance in cardiovascular diagnostics, it may be expected that new, conformation-based assays will form a tool for the assessment of a subject's vascular vitamin K status (Glu-MGP / Gla-MGP ratio). This ratio may then be used as a guidance for the further development of functional foods and food supplements with health benefit claims in the cardiovascular field.

SAMENVATTING EN ALGEMENE CONCLUSIES

Vitamine K is de verzamelnaam voor een aantal vergelijkbare stoffen die allemaal dezelfde gemethyleerde naphthoquinon ringstructuur bezitten, maar die verschillen in de alifatische zijketen, gebonden aan de 3-positie. De twee belangrijkste vormen van vitamine K zijn vitamine K₁ (fyllochinon) en vitamine K₂ (menachinonen). De belangrijkste voedselbronnen van fyllochinon zijn groene groenten zoals broccoli en spinazie, en plantaardige oliën¹⁻⁴. Menachinonen komen voornamelijk voor in vlees (menachinon-4, MK-4) en gefermenteerde producten zoals kaas en kwark (MK-6 t/m MK-9)⁴. Vitamine K functioneert als een cofactor voor het endoplasmatisch enzym gamma-glutamylcarboxylase. De carboxylering van specifieke glutaminezuur (Glu) residuen tot gamma-carboxy glutaminezuur (Gla) is een van de posttranslationale modificaties die worden uitgevoerd door het vitamine K-afhankelijke enzym gamma-glutamyl carboxylase⁵⁻⁷. De omzetting van Glu naar Gla is nodig voor de calcium bindende eigenschappen van Gla-eiwitten. Tijdens perioden van vitamine K-deficiëntie, kan de carboxyleringsreactie niet plaatsvinden en zullen er Gla-eiwitten in een niet-actieve, ondergecarboxyleerde vorm gesynthetiseerd worden. Een algemeen literatuur overzicht over vitamine K wordt weergegeven in **hoofdstuk 1** van dit proefschrift.

Vitamine K speelt een belangrijke rol in de bloedstolling: zes verschillende Gla-eiwitten zijn betrokken bij de regulatie van dit complexe proces: protrombine, factor VII, IX, and X, en protein C en S⁸. Meer recent zijn nieuwe Gla-eiwitten ontdekt die niet betrokken zijn bij het bloedstollingproces. Dit zijn onder andere osteocalcine (regulator van botvorming)^{9,10}, matrix-gla proteïne (MGP) (remmer van kraabeen en vaatwand verkalking)¹¹ en Gas6 (regulator van celgroei en remmer van apoptose)¹². Gla-eiwitten spelen dus ook een belangrijke rol in het bot en de vaatwand en deze functies vormen de basis van het in dit proefschrift beschreven onderzoek. In het eerste gedeelte beschrijven we de effecten van vitamine K-supplementatie op de botdichtheid. Lage serum vitamine K-concentraties¹³⁻¹⁵, hoge niet-gecarboxyleerde osteocalcine concentraties¹⁶⁻¹⁸ en lage innames van vitamine K¹⁹, zijn geassocieerd zijn met een lage botdichtheid en een verhoogd risico op osteoporotische heupfracturen. De twee interventiestudies beschreven in dit proefschrift, zijn de eerste studies waarin de effecten van vitamine K-supplementatie op botdichtheid onderzocht worden. In **hoofdstuk 2** hebben we het mogelijke synergistische effect onderzocht van een supplement bestaande uit mineralen en de vitaminen D en K₁ op het botverlies in postmenopausale vrouwen gedurende een periode van drie jaar. De proefpersonen ontvingen dagelijks een placebo of een supplement bestaande uit een mengsel van calcium, zink, magnesium en vitamine D₃ of hetzelfde supplement met extra vitamine K₁. Het bleek dat het supplement met mineralen en vitamine D₃ alleen een kortdurend effect had op de remming van het botverlies. De toevoeging van vitamine K₁ aan het supplement resulteerde echter in een langdurende bescherming tegen botverlies, waarbij het botverlies met 35% gereduceerd was ten opzichte van placebo. De verwachting is dat een meer complete carboxylering van het Gla-eiwit osteocalcine bijdraagt aan het geobserveerde effect, maar omdat de functie van het eiwit op moleculair niveau nog niet bekend is, blijft het achterliggende mechanisme via welke vitamine K het botverlies remt nog

onduidelijk. Het is op zijn minst opmerkelijk dat het botverlies gereduceerd werd door een eenvoudig voedingssupplement, hoewel een complete remming van het botverlies niet bereikt is in deze studie. Indien men deze resultaten extrapoleert naar langdurige behandelingsperioden, kan het gebruik van het onderzochte supplement resulteren in een significante reductie van het aantal osteoporotische fracturen. Onze resultaten worden gebruikt door de voedingsindustrie en het optimale supplement wordt op dit moment in verschillende landen op de markt gebracht.

Een tweede risicogroep voor het ontwikkelen van botverlies zijn de vrouwelijke atleten. De hoge intensiteit en belasting van training kan leiden tot een verstoring van de hormoonhuishouding, een lage endogene oestrogeen productie, amenorroe (het wegblijven van de menstruatie) en het verlies van botmassa op jonge leeftijd ^{20,21}. Hoewel deze problemen wel bekend zijn bij de sportartsen, zijn er maar weinig prospectieve studies die het botverlies in vrouwelijke atleten gekwantificeerd hebben en effecten van behandeling onderzocht hebben. In **hoofdstuk 3** beschrijven we een follow-up studie van 2 jaar omtrent een cohort van 115 vrouwelijk atleten, waarin de snelheid van botverlies gekwantificeerd is en de effecten van oestrogeen- en vitamine K-behandeling (zonder toevoeging van mineralen en vitamine D) onderzocht zijn. De proefpersonen werden gerekruteerd uit België, Duitsland en Nederland en behoorden tot de nationale top in de atletiek. De snelheid van botverlies van de femur hals was ongekend hoog in de vrouwelijke atleten en een significant hoger botverlies werd geobserveerd bij de atleten met amenorroe in vergelijking met de atleten met een regelmatige menstruatie. Oestrogeen-supplementatie verminderde wel het botverlies, maar zorgde niet voor een complete remming. In tegenstelling tot de studie in postmenopausale vrouwen, werden er geen gunstige effecten van vitamine K gevonden op de snelheid van het botverlies bij de vrouwelijke atleten. De meest voor de hand liggende verklaring voor deze schijnbare tegenstelling is dat botverlies een multifactorieel proces is waarin mineralen en vitamine D ook een belangrijke rol spelen. Als gevolg hiervan, zal een optimaal effect alleen gevonden worden indien deze componenten tegelijk met vitamine K ook gesupplementeerd worden. Een andere reden voor de discrepantie tussen de resultaten van de postmenopausale vrouwen en atleten is de accumulatie van risicofactoren voor botverlies in de atleten en het extreem hoge botverlies in deze groep. Onder deze omstandigheden is het waarschijnlijk vrijwel onmogelijk om het botverlies terug te dringen door eenvoudige voedingssupplementen en is op z'n minst medicatie (zoals bisfosfonaten) nodig om het proces stoppen.

In het tweede gedeelte van dit proefschrift wordt de rol van vitamine K in de vaatwand onderzocht. Het vitamine K-afhankelijke eiwit matrix-gla proteïne (MGP) wordt gesynthetiseerd door de gladde spiercellen in de vaatwand. In experimentele proefdierstudies is aangetoond dat MGP een remmer is van arteriële verkalking ¹¹, en dat de vijf Gla-residuen binnen het eiwit essentieel zijn voor de activiteit van MGP ²². Recente studies laten zien dat in een groot deel van de populatie de vitamine K status van de vaatwand onvoldoende is om volledige MGP carboxylering te bewerkstelligen ²³, waardoor

het risico op arteriële verkalking verhoogd is. Mogelijk dat een suboptimale vitamine K-status, verharding, verhoogde stijfheid en verlies van elastische eigenschappen van de vaatwand tot gevolg kan hebben; dit leidt op den duur weer tot een verhoogd risico op het ontstaan van hart-en vaatziekten. Verschillende studies zijn uitgevoerd om deze hypothese verder te onderzoeken. In het bekende Framingham Offspring Cohort is de associatie tussen de vitamine K-inname via de voeding en intermediaire markers van hart-en vaatziekten bestudeerd. In **hoofdstuk 4** beschrijven we de associatie tussen vitamine K-inname, levensstijl en serum lipide concentraties in dit cohort. Uit de resultaten bleek dat personen met een hoge gerapporteerde vitamine K₁-inname een gezond voedingspatroon hadden en een algemeen gezonde levensstijl. Verder waren hoge vitamine K₁-innames geassocieerd met een gunstig lipoproteïne profiel (hoog HDL-cholesterol, laag LDL-cholesterol, en een lage ratio van totaal cholesterol / HDL-cholesterol). In tegenstelling tot vitamine K₁, was de vitamine K₂-inname geassocieerd met een ongezonde levensstijl, namelijk een hoge body mass index (BMI), hoge inname van totaal vet, verzadigd vet, cholesterol, vlees en lage inname van fruit en vezel. De vitamine K₂-innames waren echter ook geassocieerd met een gunstig lipideprofiel, terwijl vitamine K₂ maar ongeveer 10% van het totale vitamine K gehalte in de voeding omvat. Het feit dat de vitamine K-inname correleerde met een gunstig lipideprofiel in associatie met zowel een gezonde als een ongezonde levensstijl is consistent met de hypothese dat een lage vitamine K inname een onafhankelijke risicofactor is voor het ontstaan van hart-en vaatziekten.

Een volgende stap in het bestuderen van de rol van vitamine K in de vaatwand was het meten van het effect van vitamine K-supplementen op vaatwandeigenschappen. De term vaatwandeigenschappen wordt gebruikt om de elastische eigenschappen van de vaatwand en de vaatwanddikte te beschrijven. Een verandering in de elastische eigenschappen van arteriën heeft implicaties voor het ontstaan van hart- en vaatziekten. Arteriën zoals de halsslagader, worden stijver met het ouder worden, en arteriële stijfheid is geassocieerd met hart-en vaatziekten ^{24,25}. Alvorens de effecten van vitamine K-supplementatie op de vaatwandeigenschappen werden onderzocht, werden eerst de effecten van veroudering op de vaatwand bestudeerd in gezonde postmenopausale vrouwen (**hoofdstuk 5**). Aan het begin en aan het einde van de 3 jaar-durende studie, werden met behulp van ultrasound de distensibiliteits coefficient (DC), compliantie-coefficient (CC) evenals de vaatwanddikte gemeten ²⁶⁻²⁸. Deze variabelen worden gebruikt om de elastische eigenschappen van de vaatwand te beschrijven. De resultaten van deze studie toonden een significante daling in DC en CC als functie van de tijd. Parallel met de gedaalde elasticiteit werd een significante stijging van de arteriële diameter en de vaatwanddikte geobserveerd. Een stijging van de arteriële diameter kan gezien worden als een adaptatie proces als gevolg van de verstijving van de vaatwand en de gestegen bloeddruk, terwijl een gestegen vaatwanddikte algemeen beschouwd wordt als een van de eerste stappen van het atherosclerose proces ^{29,30}. Het in hoofdstuk 2 beschreven cohort is ook gebruikt om de effecten van vitamine D+K-supplementatie te bestuderen op de vaatwandeigenschappen (**hoofdstuk 6**). Het supplement bestaande uit alleen mineralen en vitamine D had geen invloed op de vaatwandeigenschappen, terwijl het supplement bestaande uit mineralen, vitamine D+K een

gunstig effect bleek te hebben op de elastische eigenschappen van de halsslagader. Gedurende de hele periode van drie jaar bleven de DC,CC en ook de bloeddruk constant; de vaatwanddikte was echter wel significant gestegen en niet verschillend ten opzichte van de placebo. Dit is de eerste interventiestudie die een gunstig effect van vitamine D+K₁ laat zien op vaatwandeigenschappen. Deze resultaten zijn consistent met de hypothese dat er in de vaatwand onvoldoende vitamine K aanwezig is voor een adequate carboxylering van MGP, dat op zijn beurt een onvoldoende bescherming tegen arteriële verkalking als gevolg heeft. Klinische trials, waarin de effecten van vitamine K-supplementatie op arteriële verkalking (gemeten door geavanceerde technieken zoals CT) worden onderzocht, zijn nodig om bewijs te leveren dat vitamine K een belangrijke rol speelt in de preventie van hart-en vaatziekten.

Op basis van de huidige kennis, lijkt vitamine K zijn gunstige effect op de vaatwand uit te oefenen via MGP. MGP accumuleert niet alleen in weefsels, maar in lage concentraties komt het ook voor in de circulatie. Als de concentratie en het Gla-gehalte van MGP de vasculaire MGP-synthese zou reflecteren, dan kan het serum MGP gebruikt worden als een marker voor het risico op en de diagnose van hart-en vaatziekten. Hierbij dient onderscheid te worden gemaakt tussen tests voor totaal MGP, die gebaseerd zijn op antilichamen die elke vorm van MGP herkennen en conformatie-specifieke tests, die gebaseerd zijn op antilichamen die tegen ofwel alleen gecarboxyleerd dan wel niet-gecarboxyleerd MGP gericht zijn. In **hoofdstuk 7** beschrijven we de ontwikkeling van een assay voor totaal MGP. De resultaten laten zien dat bij patiënten met atherosclerose en diabetes mellitus de serum MGP concentratie significant hoger is dan bij gezonde controle patiënten. De test werd ook gebruikt om te demonstreren dat bepaalde promotor polymorfismen in het MGP gen geassocieerd zijn met een hoge of een lage MGP expressie en parallelle fluctuaties in MGP serum concentraties. Hoewel de resultaten duidelijk een associatie laten zien tussen serum MGP en hart-en vaatziekten, dient nog meer onderzoek te gebeuren voordat de diagnostische bruikbaarheid van deze test zichtbaar wordt.

Concluderend, in dit proefschrift hebben we aangetoond dat vitamine K₁ het botverlies remt in postmenopausale vrouwen, maar alleen als het samen gesupplementeerd wordt met mineralen en vitamine D. Dergelijke supplementen zijn dus aan te bevelen voor vrouwen die een verhoogd risico hebben op botverlies (vrouwen > 50 jaar). Als het effect aanblijft tijdens langdurig gebruik, dan is het treshhold niveau voor osteoporotische fractures met 8-10 jaar verlengd. Dit heeft een belangrijke impact op de algehele gezondheid en draagt substantieel bij aan reductie van de kosten van gezondheid. De vraag of vitamine K alleen effectief is in het tegengaan van hoog botverlies dient beantwoord te worden in vervolgstudies, aangezien dit niet aangetoond kon worden in dit proefschrift. Andere vragen die nog beantwoord dienen te worden, zijn:

1) zijn de effecten van vitamine K₁ and K₂ vergelijkbaar 2) wat is de optimale dosis voor het bereiken van een maximaal effect 3) wat is de optimale samenstelling van het supplement (bijvoorbeeld welke andere vitaminen en mineralen), en 4) is dit supplement ook gunstig voor

andere risicogroepen voor botverlies, zoals astronauten, ballet danseressen and patiënten met anorexia nervosa.

De tweede belangrijke observatie in dit proefschrift is dat vitamine K₁ het verlies aan arteriële elasticiteit bij veroudering tegengaat. Het kan niet uitgesloten worden dat ook in de vaatwand mineralen en vitaminen D+K een synergistisch effect hebben. Gebaseerd op de huidige kennis lijkt dit echter onwaarschijnlijk. De hypothese is dat het geobserveerde effect vrijwel geheel te wijten is aan de verbeterde vasculaire vitamine K status, resulterend in een meer complete MGP-carboxylering en daarmee een versterkt remmend effect van arteriële verkalking door MGP. De minimale dosis die nodig is voor het behoud van elasticiteit dient vastgesteld te worden en ook de vraag of het effect aanblijft tijdens langdurig gebruik (> 3 jaar) van vitamine K supplementen is nog onbeantwoord. Zonder twijfel heeft dit onderzoek de potentie om te leiden tot een doorbraak in de primaire en secundaire preventie van hart- en vaatziekten.

De resultaten over de bruikbaarheid van serum MGP als een marker voor hart- en vaatziekten zijn veelbelovend, maar dienen verder onderzocht te worden. De beschreven assay is een typische home-made laboratorium test en dient verder ontwikkeld te worden na de eerste publicatie. Naast de test voor totaal circulerend MGP antigen, zijn assays voor gecarboxyleerd en ondergecarboxyleerd MGP antigen dringend nodig. Monoclonale antilichamen waar zulke assays op gebaseerd zijn, worden momenteel ontwikkeld. Data die gepresenteerd worden in dit proefschrift, demonstreren de mogelijkheid van een diagnostische benadering en vormen de start van een onafhankelijke diagnostische lijn binnen onze onderzoeksgroep. Naast het belang voor de cardiovasculaire diagnostiek, kan verwacht worden dat nieuwe conformatie-specifieke assays een instrument vormen voor de vaststelling van de vitamine K status van een persoon (Glu-MGP / Gla-MGP ratio). Deze ratio kan dan gebruikt worden als richtlijn voor de verdere ontwikkeling van functional foods en voedingssupplementen met gezondheid claims op het gebied van hart-en vaatziekten.